

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

氏 名 山次 康幸

論文題目 植物 1 本鎖 RNA ウイルスの遺伝子構造と複製に関わる宿主因子に関する研究

植物 1 本鎖 RNA ウイルスは植物ウイルスの 70%以上を占めており、農作物生産に甚大な被害を与えるだけでなく、その防除は極めて困難である。本研究ではこの植物 1 本鎖 RNA ウイルスを対象にその遺伝子構造の解析と複製に関わる宿主因子の分子生物学的解析を行った。

1. 植物 1 本鎖 RNA ウイルスの種のボーダーラインに関する解析

チューリップ X ウイルス (TVX, *Tulip virus X*) は長さ約 495 nm、幅約 13 nm のひも状ウイルスであり、*Flexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属する。TVX はチューリップに感染し、葉に退緑斑および壊死斑を生じ、花卉には線状斑を形成する。1982 年にスコットランドで初めて発見された (Mowat, 1982) が、本邦では 1994 年、日本で隔離検疫中のオランダ産チューリップから分離され (藤原ら, 1994)、1997 年には新潟県で栽培中のチューリップから分離される (宮川ら, 1997) などその被害が広がりつつあり早急な対策が望まれている。しかし、TVX はその性状が明らかではなく、従って抗体や PCR などによる感染植物からの検出技術も確立していなかった。そこで、本研究では TVX のゲノムの全塩基配列を解読し、系統解析によりその分類学的性状を明らかにした。

TVX の遺伝子構造

TVX 新潟分離株 (TVX-J) のゲノム RNA の全長塩基配列を解読したところ 3'末端の polyA 配列

を除き全長 6056 塩基からなることが明らかになった。ゲノムには5つの open reading frame (ORF) が含まれていて、5'非翻訳領域 (UTR, untranslated region) は 95 塩基、3'UTR は 130 塩基であった。ORF1 には 153 kDa 複製酵素タンパク質 (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase)、ORF2、3、4 には 25 kDa、12 kDa、10 kDa トリプルジーンブロック (TGB, triple gene block) タンパク質、ORF5 には 22 kDa 外被タンパク質 (CP, coat protein) がコードされ、典型的な *Potexvirus* 属ウイルスの遺伝子構造を示した。

分子系統学的解析

TVX の分類学的所属を明らかにする目的で、各 ORF にコードされる遺伝子について系統学的解析を行ったところ、TVX は *Potexvirus* 属ウイルスであると判断された。またオオバコモザイクウイルス (PIAMV, *Plantago asiatica mosaic virus*) と最も近縁であり、各タンパク質配列の identity も極めて高い値を示した。そこで、TVX と PIAMV のタンパク質配列の identity を *Potexvirus* 属ウイルスの種間の identity および系統間の identity と比較し、pairwise 解析 (Shukula and Ward, 1988) を行った。CP の pairwise 解析では TVX と PIAMV は同一種と判断されたが、RdRp や TGB を用いた解析では異種と判断された。以上の結果と生物学的・理化学的性状などをもとに総合的に判断した結果 TVX と PIAMV は近縁ではあるが異種ウイルスであると結論づけられた。

以上のように本研究では TVX の全塩基配列を明らかにするとともに TVX と PIAMV が近縁な異種ウイルスであることを明らかにした。最近、属レベル以上の分類には RdRp 遺伝子、種レベルの分類には CP 遺伝子が用いられている。しかし、本研究により 1 本鎖 RNA ウイルスの分類は CP のみでは種レベルにおいて分類に支障を生じるケースが見出されるため、分類基準を見直す必要があることを示した。すなわち、*Potexvirus* 属をモデルに CP のみならずその上流の遺伝子も比較し生物学的性状とも併せ、総合的に判断する必要があることを示した。

2. 植物 1 本鎖 RNA ウイルスの複製に関わる翻訳伸長因子の解析

ウイルスの防除が極めて困難である背景には、ウイルスが宿主の遺伝子産物の多くを巧みに利用しながら増殖や移行を行うため、その増殖のみを特異的に抑える戦略を立てにくいというジレンマがある。この状態を克服するためには、ウイルス感染に関与する宿主因子がウイルスの複製・移行にどのように関わるかを明らかにすることが必要である。RNA ウイルスの複製に関連して、これまで様々な宿主因子の関与が報告されてきたが、中でも翻訳伸長因子 (EF, translation elongation factor) の関与が数多く報告されており、動植物を通じて RNA ウイルスの複製に普遍的に関与している可能性が考えられる (Lai, 1998)。2002 年に wheat germ extract より単離された eEF1A (eukaryotic translation elongation factor 1A) がタバコモザイクウイルス (TMV, *Tobacco mosaic virus*) ゲノム RNA の 3'UTR に結合することが明らかにされた (Zeenko *et al.*, 2002)。そこで本研究では、eEF1A が TMV の RNA 複製に際し、担っている機能について解析を行った。

2-1. 翻訳伸長因子と TMV 複製因子の結合解析

eEF1A と TMV ゲノム RNA の結合解析

Nicotiana tabacum cv. Xanthi からタバコ *eEF1A* 遺伝子をクローニングし、得られた配列をもとに大腸菌内で eEF1A を大量に発現させ精製した。これを用いて、以下の研究を行うとともに、その抗体を作出した。次いで、eEF1A と TMV ゲノム RNA との結合を GST pull-down 法およびゲルシフト法で解析したところ、eEF1A は TMV 3'UTR と結合することが明らかになった。

eEF1A と TMV RdRp の結合解析

eEF1A と TMV RdRp との結合を免疫沈降法により解析した。TMV 感染タバコより RdRp を多く含む画分を抽出し、抗 eEF1A 抗体により免疫沈降を行った。沈降画分に TMV RdRp が検出されたことから、両者が *in vivo* で結合することが示された。次いで TMV RdRp の部分領域と eEF1A を酵母内で発現させ、酵母 two-hybrid システムを利用してそれらの間の結合を検出したところ、eEF1A が TMV RdRp の M ドメインと結合することが示された。

以上の結果より eEF1A は TMV ゲノム RNA および RdRp と結合することが示された。TMV RdRp が多様な機能をもつことから、eEF1A がそれらに関わる可能性も考えられた。

2-2. 複製における翻訳伸長因子の機能解析

eEF1A の TMV 感染への影響

eEF1A が TMV の感染に与える影響について調べる目的で、ジャガイモ X ウイルス (PVX, *Potato virus X*) ベクターを用いた virus-induced gene silencing (VIGS) 法を用いて *eEF1A* のサイレンシングを誘導し、TMV 感染に対する影響を調べた。その結果、*eEF1A* サイレncing 区では対照区に比べ蓄積量が減少した。さらに *eEF1A* のサイレンシングが TMV の増殖を抑制する様子を可視化するため、緑色蛍光タンパク質 (GFP, green fluorescent protein) 発現 TMV ベクター (TMV-GFP-CP) を接種し、感染葉を蛍光観察したところ、TMV-GFP-CP による蛍光斑の面積は *eEF1A* サイレncing 区では対照区と比較して著しく縮小した。

eEF1A の TMV RNA 複製への影響

eEF1A のサイレンシングにより TMV の感染が抑制されることを示したが、植物ウイルスの感染過程には主に単細胞での複製と細胞間移行の2つのステップがあり、eEF1A がそのどちらに関わるかは明らかではない。そこで、これを解析するためにタバコプロトプラストにおける TMV の RNA 複製に対する eEF1A の影響を調べた。*eEF1A* を過剰発現するタバコ培養細胞を作製し、そこから抽出したプロトプラストにおける TMV RNA の複製を解析したところ、eEF1A 過剰発現タバコプラストでは野生型タバコプラストと比較して TMV RNA 蓄積量が増加したことから、eEF1A の過剰発現により TMV RNA の複製が促進されることが示唆された。

eEF1A の翻訳への影響

eEF1A が TMV の RNA 合成に影響を与えているのか、TMV タンパク質や TMV 感染に関わる宿主タンパク質の翻訳に影響を与えているのかを明らかにするため、*eEF1A* のサイレンシングにより宿主翻訳活性に与える影響について調べた。アグロインフィルトレーションにより植物体に GFP を発現させ、GFP の RNA 量とタンパク質量を比較し、翻訳活性を調べたところ、*eEF1A* のサイレンシングは GFP mRNA の翻訳に影響を与えないことが示された。このことは、*eEF1A* が TMV RNA 複製における RNA 合成に関わっていることを示すものである。

TMV 感染タバコプロトプラストにおける eEF1A と VRC の細胞内局在

感染細胞におけるウイルス複製複合体 (VRC, virus replication complex) と *eEF1A* の細胞内局在を観察を行った。まず *eEF1A* の局在を調べるため、*eEF1A* と GFP の融合タンパク質 (*eEF1A*:GFP) をプロトプラストで発現させたところ、複雑なネットワーク状の局在を示した。しかし、ER 阻害剤である brefeldin A を処理したところ、局在が大きく変化し、細胞内が一様に染色された。このことから、*eEF1A* は ER に局在することが示された。一方、TMV VRC には移行タンパク質 (MP, movement protein) が含まれることが明らかにされており (Heinlein *et al.*, 1998)、MP と GFP の融合タンパク質 MP:GFP を経時的に観察することにより VRC の観察が可能である (Asurmendi *et al.*, 2004)。そこで MP:GFP を発現する TMV ベクター TMVom-MP:GFP を作出し、TMVom-MP:GFP 感染プロトプラストに対して抗 *eEF1A* 抗体で免疫染色を行ったところ、VRC は抗 *eEF1A* 抗体で染色された ER 膜上に分布しており、VRC の集積により形成される大型の VRC は ER 膜の窪みに形成される様子が観察された。これらの結果より、*eEF1A* が TMV 複製の場に深く関わるということが明らかになった。

以上、本研究では *eEF1A* の TMV 感染機構における関与について解析し、*eEF1A* が TMV ゲノム RNA の 3'UTR および TMV RdRp と結合すること、*eEF1A* のサイレンシングにより TMV の RNA 複製が阻害されること、TMV VRC が *eEF1A* が局在する ER 膜上に分布することなどから、*eEF1A* が TMV の RNA 複製に強く関与していることを明らかにした。

以上を要するに、本研究では植物 1 本鎖 RNA ウイルスに種のボーダーラインの概念を導入し、従来の分類基準に一石を投じた。また、植物 1 本鎖 RNA ウイルスの複製に関わる宿主翻訳伸長因子について解析することにより、翻訳伸長因子が動植物を通じて RNA ウイルスの複製に深く関わる事を明らかにした。